

## MICROSCOPY SYSTEMS PARTICULARLY ADAPTED FOR VIEWING TRANSPARENT OBJECTS

Patent Number:  GB1502657

Publication date: 1978-03-01

Inventor(s):

Applicant(s): HOFFMAN R (US)

Requested Patent:  DE2523464

Application Number: GB19750015267 19750414

Priority Number(s): US19740503394 19740905

IPC Classification: G02B21/06

EC Classification: G02B21/14

Equivalents: CA1031199,  FR2284126

### Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(5)

Int. Cl. 2:

G 02 B 21/00

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DT 25 23 464 A1

(11)

# Offenlegungsschrift 25 23 464

(21)

Aktenzeichen: P 25 23 464.4

(22)

Anmeldetag: 27. 5. 75

(43)

Offenlegungstag: 18. 3. 76

(30)

Unionspriorität:

(32) (33) (31)

5. 9.74 USA 503394

(54)

Bezeichnung:

Mikroskopiersysteme, insbesondere geeignet zum Betrachten transparenter Objekte

(71)

Anmelder:

Hoffman, Robert, Merrick, N.Y. (V.St.A.)

(74)

Vertreter:

Glawe, R., Dr.-Ing.; Delfs, K., Dipl.-Ing.; Moll, W., Dipl.-Phys. Dr.rer. nat.; Mengdehl, U., Dipl.-Chem. Dr.rer. nat.; Pat.-Anwälte,  
8000 München u. 2000 Hamburg

(72)

Erfinder:

gleich Anmelder

2523464

Robert Hoffman

Mikroskopiersysteme, insbesondere geeignet zum Betrachten transparenter Objekte

Die Erfindung betrifft optische Systeme im allgemeinen und insbesondere eine verbesserte Vorrichtung, welche insbesondere zur Verwendung in einem Mikroskopiersystem geeignet ist, um es dem Betrachter zu ermöglichen, Phasenobjekte, bzw. durchsichtige Objekte zu betrachten.

Aus dem Stand der Technik ist bekannt, daß gewisse Objekte mit einem gewöhnlichen Mikroskop und mit gewöhnlicher Beleuchtung nicht betrachtet werden können. Derartige Objekte sind unter solch gewöhnlichen Bedingungen im wesentlichen durchsichtig und werden manchmal als Phasenobjekte bezeichnet.

Ein solches Objekt kann beispielsweise eine dünne transparente, aber inhomogene Schichte sein, welche beispielsweise aus einem optisch dichteren Körper besteht, welcher in einem dünneren Umgebungsmedium eingebettet ist, wobei zwischen Objekt und Medium eine relativ scharfe Grenze besteht. Sowohl das Objekt als auch das Medium haben relativ gleiche Durchlässigkeit, aber sie weisen auch einen Unterschied in der Phase auf.

In einem gewöhnlichen Mikroskop gewährleisten Phasenunterschiede gleiche Intensität und daher ist das Objekt vom Medium nicht zu unterscheiden oder das Objektbild ist vom benachbarten Bild nicht zu unterscheiden.

Da außerdem das Auge für Intensität und nicht für Phase empfindlich ist, sind derartige Objekte unsichtbar, auch wenn sie die Phase der durch sie hindurchtretenden Lichtwelle verzögern oder beschleunigen.

Es gibt eine Reihe von Spezialmikroskopen, die es dem Benutzer ermöglichen, solche Phasenobjekte zu betrachten. Derartige Mikroskope werden als Phasenkontrastmikroskope oder als  
609812/0271

Interferenzmikroskope bezeichnet. Eine gute Beschreibung dieser Art von Mikroskopen gibt das Buch "Analytical Cytology" von R. Barer, Kapitel 3., Verlag McGraw-Hill, N.Y. (1965). Das Phasenkontrastmikroskop, welches manchmal als Zernike Phasenkontrastmikroskop bezeichnet wird, ist mit einer Phasenplatte ausgestattet. Eine solche Platte weist in der Mitte eine ringförmige Region auf, welche sich mit einer ringförmigen Öffnung im Lichtquellengehäuse deckt; die mittlere Region wird beispielsweise durch das Ablagern eines Ringes aus einem phasenändernden Medium gebildet, welches zusätzlich ein absorbierendes Medium hat, das dazu dient, dem gesamten auf dem Bild auftreffenden Licht durch die mittlere Region einen Weg zu schaffen, welcher sich um ein Viertel einer Wellenlänge von dem Licht unterscheidet, das an der mittleren Region vorbeigeht. Aufgrund dieser Region ist daher das Bild des Objektes entweder heller oder weniger hell als das der Umgebung, was vom an der Phasenplatte eingeführten Phasenunterschied abhängt. In einem solchen System erzeugt gebrochenes Licht, welches durch die mittlere Region hindurchgeht, Lichthöfe um das Bild.

Das Interferenzmikroskop ist auch eine Phasenvorrichtung und funktioniert ebenfalls durch Einführen einer Inhomogenität, um eine Phasenverschiebung zu bewirken und um dadurch zu ermöglichen, ein Objekt von seiner Umgebung unterscheiden zu können. Ein Nachteil des Interferenzmikroskops besteht im Lichtverlust an den einzelnen halbreflektierenden Oberflächen und in der Notwendigkeit der Polarisation, sowie in der Abhängigkeit von spannungsfreien optischen Teilen und schließlich in der hohen Präzision, welche für die Konstruktion doppeltbrechender Elemente notwendig ist. Derartige Mikroskope werden häufig in der Gewebeuntersuchung und auf ähnlichen Gebieten verwendet.

Vor kurzem wurde eine neue Vorrichtung geschaffen, welche Gegenstand der US Anmeldung Nr. 476 518 vom 5.Juni 1974 mit dem Titel "Kontrastmodulationsmikroskop" ist.

Diese Vorrichtung verwendet die Größe der Amplitude des durch ein Phasenobjekt hindurchtretenden Lichtstrahles.

Dadurch daß man ausgewählte Abschnitte der Amplitude des Lichtes verwendet, welches durch die Fourier Ebene eines optischen Systems, wie es z.B. in einem Verbundmikroskop gegeben ist, hindurchtritt, kann man die Phasengradienten eines transparenten Objektes sichtbar machen, indem man die Phaseninformation in Intensitätsschwankungen in der wirklichen Bildebene des Mikroskops umwandelt. Die Anmeldung beschreibt einen einzigartigen und billigen Modulator, welcher in der Fourier Ebene angeordnet ist und Regionen mit unterschiedlicher Durchlässigkeit hat, was dazu dient, Unterschiede in der Lichtamplitude zu schaffen, welche solche Phasenobjekte vollkommen sichtbar machen.

Durch die vorliegende Erfindung werden die Nachteile des Phasenkontrastmikroskops und des Interferenzmikroskops ausgeschaltet. Ziel der Erfindung ist es, Objekte auf einfachere Art und unter Verwendung billigerer Bestandteile sichtbar zu machen. Dieses Ziel wird erfindungsgemäß durch eine Vorrichtung zur Untersuchung mikroskopischer, transparenter Objekte erreicht, welche aus einem Verbundmikroskop besteht, in welchem eine Einrichtung zur Beleuchtung des Objektes mithilfe eines gesteuerten Lichtstrahles vorgesehen ist. Eine weitere Einrichtung zum selektiven Modulieren der Amplitude von Abschnitten dieses Strahles nach seinem Hindurchtreten durch das Objekt ist ebenfalls vorhanden. Daraufhin treffen sich die Strahlen wieder, um im Bild zu interferieren, worauf Phasengradienten im Objekt sichtbar gemacht werden.

Ein Mittel zur Herstellung eines gesteuerten Strahles zur Beleuchtung des Objektes besteht in einem eng gewendelten Leuchtfaden von im allgemeinen rechteckiger Konfiguration, welcher in einer der Fourier Transformationsebene konjugierten Ebene angeordnet ist. Dann wird der Faden durch den Kondensor und das Objektiv des Mikroskops abgebildet, um eine Fourier Transformationsebene zu schaffen. Ein Lichtmodulator mit Abschnitten unterschiedlicher Densität ist in der Fourier Transformationsebene angeordnet, sodaß das Bild des Fadens auf eine spezifische Region des Modulators fällt und mit dieser abgestimmt wird. Ist kein Objekt vorhanden, so tritt das gesamte durch das Mikroskop hindurchtretende Licht durch diese

Abstimmungsregion. Zu beiden Seiten dieser spezifischen Region befindet sich je eine Region mit unterschiedlicher Densität, bzw. optischer Durchlässigkeit, so daß das durch den Modulator weitergegebene Licht auf der einen Seite des Fadenbildes von viel größerer Intensität ist als auf der anderen Seite des Bildes. Licht, welches durch diesen neuen Modulator hindurchtritt, wird in der Bildebene des Mikroskops verteilt, interferiert selektiv und macht so Phasengradienten sichtbar. Die relative Helligkeit des Gradienten gegenüber der Hintergrundintensität ist das Verhältnis der Entfernung, in der das Bild des Fadens zur Breite der abgestimmten Region des Modulators verschoben ist.

Die Erfindung wird nun anhand der Zeichnungen näher erläutert, wobei Fig. 1 ein Diagramm einer schematischen Darstellung einer Ausführungsform der optischen Elemente entlang der optischen Achse des Mikroskops darstellt. Fig. 1A bis 1B sind schematische Diagramme optischer Bestandteile gemäß Fig. 1 im Grundriß. Fig. 2 ist ein diagrammatischer Grundriß einer verwendeten Lampenanordnung. Fig. 2A zeigt einen diagrammatischen Grundriß eines Modulators in der Fourier Transformationsebene auf der Rückseite des Objektivs. Fig. 3 veranschaulicht schematisch das erfindungsgemäße Verfahren. Fig. 4 ist ein Diagramm der relativen Lichtdurchlässigkeit einer erfindungsgemäß verwendeten Ausführungsform des Modulators. Fig. 5 zeigt die Betrachtung eines trapezförmigen Objektes und eine graphische Darstellung seines Bildes durch das Mikroskop. Fig. 6 ist eine ähnliche Ansicht wie Fig. 5, doch zeigt sie ein in der Betrachtung aus bogenförmigen Abschnitten bestehendes Objekt. Fig. 7 ist eine schematische Darstellung einer anderen Ausführungsform der Erfindung zur Betrachtung opaker Objekte mittels Reflektion. Fig. 8 ist ein Grundriß eines erfindungsgemäß verwendeten Modulators. Fig. 9 ist eine Draufsicht auf eine abgeänderte Ausführungsform des Modulators und Fig. 10 stellt eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Modulators dar.

Wie bereits erwähnt wird in der US Anmeldung Nr. 476 518 ein Mikroskop beschrieben, welches die Kontrastmodulation verwendet, um die Betrachtung eines Phasenobjektes zu ermöglichen.

In jener Anmeldung ist der Modulator im Detail beschrieben, ebenso wie die Verwendung einer beliebigen Öffnung, bzw. eines Schlitzes, welche verwendet wird, um die Fourier Ebene oder die Ebene zu erzeugen, in der der Modulator angeordnet ist. Wie noch nachfolgend beschrieben werden wird, hat man gefunden, daß der Schlitz, bzw. die Öffnung, weggelassen und in der Funktion durch eine Lampe ersetzt werden können. Die Lampe hat einen bandförmigen Faden oder einen eng gewendelten Faden. Ein wesentliches Merkmal besteht darin, daß der Faden der Lampe relativ flach und rechteckig ist. Auf diese Weise wird bewirkt, daß das Bild des Fadens mit der Fourier Ebene zusammenfällt und direkt auf sie und somit auf den dort angeordneten Modulator fällt. Dadurch daß die Öffnung wegfällt, erzielt man eine höhere Wirksamkeit, u.zw. dadurch, daß eine größere Intensität und Gleichmäßigkeit des Lichtes am Modulator, bzw. in der Fourier Ebene gegeben ist.

In der nachfolgenden Beschreibung der Zeichnungen wurden gleiche Zahlen zur Bezeichnung gleicher Teile verwendet. Während hier die Verwendung des Modulators und die Technik eines Verbundmikroskopes beschrieben ist, wird vorausgesetzt, daß die Technik und Struktur auch auf dem allgemeinen Gebiet der optischen Instrumente vorteilhaft angewendet werden kann.

In Fig. 1 ist ein erfundungsgemäßes Verbundmikroskop dargestellt. Mit 1 ist eine Lichtquelle bezeichnet, welche in einer Glühlampe oder einer ähnlichen Lampe mit eng gewendeltem Faden besteht; dieser Faden ist im allgemeinen flach und rechteckig und wird auch als Bandfaden bezeichnet. Ein Beispiel für eine geeignete Lampe ist die 9A/TA - 6 Volt Lampe, welche von vielen Firmen erzeugt wird.

Das Licht vom bandförmigen Faden der Lichtquelle 1 wird durch die Kondensorlinse 5 und das Objektiv 7 fokussiert, um die Fourier Transformationsebene herzustellen, welche die Lage des Modulators 8 bestimmt. Diese Fourier Ebene wird durch die Fokussierung oder die Konzentrierung des Bildes der Lampe 1 auf die mittlere Region des Modulators 8 geschaffen.

Zur näheren Erläuterung der Erfindung sind jene Bilder, welche in allen der Lichtquellenöffnung konjugierten Ebenen erzeugt werden, auf der linken Seite der Fig. 1 im Grundriß dargestellt. Eine Ansicht des Objektes und seiner entsprechenden Bilder, welche in den darauffolgenden konjugierten Ebenen erzeugt werden, sind auf der rechten Seite im Grundriß dargestellt.

Der Faden der Lampe 1 kann zuerst mittels der Fokussierungslinse 2, welche ein typischer Bestandteil eines gewöhnlichen Mikroskopes ist, fokussiert werden. Die Funktion der Linse 2 besteht im allgemeinen darin, zur Vergrößerung oder Verkleinerung des Fadenbildes beizutragen, um zu gewährleisten, daß das Bild auf der mittleren Region des in der Fourier Ebene angeordneten Modulators 8 genau registriert werden kann. Eine optisch plane Glasplatte oder ein Prisma 4 kann vor dem Kondensor 5 angeordnet sein oder sie kann je nach dem verwendeten optischen System anderswo angeordnet sein oder sie kann auch weggelassen werden. Die optische Platte 4 kann um ihre Achse gedreht oder gekippt werden und dient dazu, das Bild des Fadens gegenüber der Abstimmregion 19 des Modulators 8 zu verschieben. Dem Benutzer der Vorrichtung wird es dadurch ermöglicht, das Ausmaß der Kontrastmodulation zu steuern. Der Lichtstrahl oder das Bild des Leuchtfadens wird sodann auf an sich bekannte Weise durch den Kondensor 5 zerstreut, um das gesamte Feld des Mikroskopes zu umfassen oder zu decken, während sich das Objekt in der Objektebene 6 befindet.

Der Strahl tritt durch die Objektebene 6 und von dort durch das Objektiv 7 hindurch, welches dazu dient, um das Bild des Leuchtfadens in der Fourier Transformationsebene 8, die, wie dargestellt, hinter dem Objektiv 7 oder auf der Rückseite des Objektivs 7 angeordnet ist, in den Fokus zu bringen. Bekanntlich gibt es jedoch viele Fourier Ebenen und in der Praxis könnte die Ebene vor dem Objektiv 7 angeordnet sein und viele der Vorteile der Erfindung würden dennoch erhalten bleiben.

Auf jeden Fall wird das Bild des Fadens auf dem Modulator 8, welcher sich in dieser Ebene befindet, genau registriert. Das Registrieren wird erreicht, wenn das gesamte

Licht, welches fokussiert wurde und für den Leuchtfaden repräsentativ ist, bei Fehlen eines Objektes in der Objektebene 6 durch die mittlere Abstimmregion 19 des Modulators hindurchtritt (siehe Fig. 2A).

Das Objekt 15 in der Ebene 6 wird durch das Objektiv abgebildet und erzeugt ein wirkliches Bild 16 in der Bildebene 9. Die Bildebene 9 ist die Ebene des wirklichen Bildes, wie sie in der herkömmlichen Mikroskopierterminologie verstanden wird. Das Okular 10 ist vor der Gesichtsebene 11 angeordnet, wo sich eine Kamera, ein Film oder das Auge des Beobachters befinden, um das Bild des Objektes 15 entweder zu betrachten, zu speichern, zu photographieren oder zu verarbeiten.

Während in der vorhin erwähnten Anmeldung eine Öffnung beschrieben ist, welche dazu dient, ein auf dem Modulator 8 zu fokussierendes Bild zu erzeugen, kann diese Öffnung beispielsweise durch den Leuchtfaden 18 gemäß Fig. 2 ersetzt werden.

Es gibt viele Lampen mit eng gewendeltem Faden. Geeignete Ausführungsformen werden in der Autoindustrie verwendet. Im allgemeinen sind gewisse derartige Fäden zylindrisch gewickelt und erscheinen im Grundriß rechteckig. Es gibt auch runde Drahtfäden, welche im Grundriß ebenfalls rechteckig erscheinen. Einige Firmen stellen Lampen mit einem flachen bandförmigen Faden her. Jeder dieser Fäden erfüllt seinen Zweck, solange die Beleuchtung bzw. Intensität gleichmäßig ist und solange das Bild des Fadens in der Fourier Ebene in einer gleichmäßigen Lichtspur fokussiert oder registriert werden kann. Die Form des Fadens ist also von Bedeutung, aber dennoch nicht kritisch, solange die Funktionen erfüllt werden und daher gibt es eine große Anzahl von im Handel erhältlichen Lampen, welche geeignet sind.

Der in der Fourier Transformationsebene angeordnete Modulator 8 ist in Fig. 2A dargestellt.

Wie bereits erwähnt, wird bei Nichtvorhandensein eines Objektes in der Objektebene 6 das Bild des rechteckigen Fadens vom optischen System nur auf der mittleren Region 19 des

Modulators 8 fokussiert. Diese mittlere Region hat eine bestimmte Durchlässigkeit, welche so gewählt ist, daß ein Teil des hindurchtretenden Lichtes absorbiert und der Rest weitergegeben wird. Das weitergegebene Licht wird bestimmt für die Hintergrundbeleuchtung und Regionen des Objektes ohne Phasengradienten, um es zu ermöglichen, daß man eine Phase oder ein Objekt mit deutlich sichtbaren Kontrasteffekten betrachten kann.

Zu beiden Seiten der mittleren Region 19 des Modulators 8 sind die Region 20, bzw. 21 angeordnet. Jede der Regionen 19, 20 und 21 hat eine unterschiedliche Durchlässigkeit, wobei die äußere Region 20 eine größere Durchlässigkeit hat als die Region 19, deren Durchlässigkeit wiederum größer ist als die der Region 21. Ein Diagramm (Fig. 4) der Durchlässigkeit entlang des Durchmessers des Modulators zeigt eine der zahlreichen Alternativen in der Auswahl der Durchlässigkeit für die einzelnen Modulatorregionen. Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, werden Beziehungen dargestellt, die nur als Beispiel dienen und die relativen Niveaus können davon abweichen. In Fig. 2A ist zwar ein Modulator mit einem mittleren Streifen 19 dargestellt, aber andere Konfigurationen erfüllen ebenfalls den Zweck, solange eine bestimmte Region tatsächlich von mindestens einer anderen Region unterschiedlicher Durchlässigkeit umgeben oder mit dieser assoziiert ist.

Angenommen ein transparentes Objekt oder ein Phasenobjekt befindet sich in der Objektebene 6. In einem derartigen Objekt kann, wie bereits erwähnt, die Amplitude oder die Intensitätsvariation des hindurchtretenden Lichtes mit einem gewöhnlichen Mikroskop nicht beobachtet werden und daher kann man das Objekt vom Hintergrund nicht unterscheiden. Ein derartiges Objekt hat jedoch einen Phasengradienten, der eine Richtungsphasenverschiebung des Beleuchtungsstrahles verursacht. Der Phasengradient beruht auf den Unterschieden im Brechungsindex und in der Dicke. Daher bewirkt das Phasenobjekt, daß Licht aus der mittleren Region 19 des Modulators 8 heraus gebrochen wird.

Angenommen, das zu betrachtende Objekt ist eine transparente flache Scheibe, wie viele Gewebszellen es sind. Die Zelle unterscheidet sich in ihrem Brechungsindex vom sie umgebenden Medium. Der Rand zwischen Zelle und Medium kommt

in der Form einem Prisma nahe. Licht, welches in die Objekt-ebene eintritt, in der sich die Zelle befindet, wird gegen die Grundfläche des Prismas am unteren Ende der Zelle abgelenkt. Dadurch wird das Bild des Fadens, bzw. der Lichtquelle in der Fourier Ebene auf die eine oder die andere Seite verschoben, je nach dem Brechungsindex. Auf ähnliche Weise wird Licht, welches auf der anderen Seite der Zelle eintritt, annähernd einem Prisma begegnen, welches Licht auf die gleiche Weise nach der anderen Seite hin ablenkt. Ein Gradient, bzw. eine Neigung, kann als winziges Prisma betrachtet werden. Aufgrund aller dieser Brechungen ergibt sich eine Lichtablenkung von der mittleren Region aus, entweder nach der optisch weniger dichten Seite des Modulators oder nach der optisch dichteren Seite des Modulators. Bei der Bildung des wirklichen Bildes vereinigt die Optik des Mikroskops Licht aus allen Abschnitten des Modulators, wobei die sich ergebende Interferenz den Kontrast im beobachteten Bild herstellt. Licht von Brechungsindexgradienten abgelenkt in die eine Richtung wurde mit größerer Intensität übertragen als Licht von Brechungsindexgradienten abgelenkt in die andere Richtung. Wenn sich derartige Strahlen im Bild treffen, heben sie einander nicht auf. Es ergibt sich sodann ein sichtbares Bild für Phasenobjekte.

Dieser Effekt ist vorhanden, wenn man bedenkt, daß die Fourier Transformationsebene nicht nur die räumlichen Frequenzen des Objektes verteilt sondern auch die maximale Energie für jeden Punkt auf dem Gradienten des Objektes.

Der Begriff Kontrastmodulation bezeichnet ein System, welches Lichtamplitudenunterschiede um eine mittlere Region sowohl in größerer und in geringerer Intensität erzeugt. Daher weisen die um die mittlere Region angeordneten Regionen eine stärkere und eine geringere Durchlässigkeit auf, um die oben beschriebenen Ergebnisse zu erzielen.

Die Einfachheit des Modulators 8 ist bekannt und tatsächlich kann der Modulator 8 aus Film, wie er für die Photographie verwendet wird, hergestellt werden. Die in Fig. 2A

dargestellte Oberfläche kann erzielt werden, indem man den Film einfach gemäß der gewünschten Konfiguration und mit dem Licht, welches nötig ist, um die drei Regionen unterschiedlicher Durchlässigkeit zu erhalten, belichtet. Es können auch andere Techniken angewendet werden, wie z.B. optische Überzüge auf Glas, Plastik, etc. Wie man sieht, ist es also möglich, Phasenobjekte mittels der Phasenkontrasttechnik und/oder der Interferenztechnik billiger zu betrachten.

Ein idealisiertes Phasenobjekt ist in Fig. 3 dargestellt. Die Phase von Strahl 1 und 2 kann durch  $e^{-i\delta}$  ausgedrückt werden, wobei  $\delta$  der Phasenunterschied in Bezug auf eine Welle 5,  $e^{-iK_A z}$  ist, welche nicht durch das Objekt hindurchtritt. Die Phase von Strahl 3 und 4 kann durch  $e^{-i\phi x}$  ausgedrückt werden.

Da  $e^{-iK z_3}$  Strahl 3 und  $e^{-iK z_4}$  Strahl 4 ist, wobei  $K = (N_o - N_m)K_A$ , worin  $N_o$  der Brechungsindex des Phasenobjektes und  $N_m$  der Brechungsindex des umgebenden Mediums ist, so ist die Neigung der Ränder des Objektes,  $\tan \alpha$ , gleich  $\Delta z / \Delta x$  und da  $\Delta x$  sich Null nähert, nähert sich  $\tan \alpha$   $dz/dx$ , die Neigung bzw. der Gradient für diese Darstellung ist bezogen auf  $z = xt \tan \alpha$ ; daher  $\phi = kt \tan \alpha$ . Wenn man in der Fourier Transformationsebene nur eine seitliche Dimension betrachtet, kommt die Amplitude  $U(\theta)$  einem Fourier Integral sehr nahe:

$$U(\theta) = \int_{-\mathcal{D}/2}^{+\mathcal{D}/2} e^{-i\phi x} e^{-i\theta x} dx.$$

Ist  $d$  die Dimension des Phasenobjektes, sodaß  $\mathcal{D} = \frac{2\pi d}{\lambda}$  und ist  $\theta$  die Winkeldimension auf der Fourier Ebene, ergibt sich für die Region A bis B folgende Lösung:

$$U(\theta) \approx \frac{\mathcal{D} \sin [\frac{\mathcal{D}}{2} (\theta - \phi)]}{[\frac{\mathcal{D}}{2} (\theta - \phi)]}$$

Für die Neigung C nach D ergibt sich:

$$U(\theta) \approx \frac{\mathcal{D} \sin [\frac{\mathcal{D}}{2} (\theta + \phi)]}{[\frac{\mathcal{D}}{2} (\theta + \phi)]}$$

Maximale Energie tritt in der Fourier Transformationsebene auf, wenn:

$$\Theta \pm \phi = 0, \quad \Theta = \pm \phi$$

daher kann eine Nullordnung (maximale Amplitude) nicht bei  $\Theta = 0$  oder im Zentrum des Bildes der Lichtquelle auftreten, wenn ein Phasengradient vorhanden ist;  $\Theta$  ist direkt proportional dem Phasengradienten vom Zentrum und verteilt so die maximale Energie der Quelle vom Zentrum weg. Diese Energie kann durch die Übertragungsfunktion in der Fourier Ebene in der Form eines Modulators selektiv absorbiert werden. Die Modulatorregionen (Fig. 4) bestehen aus einem schmalen mittleren Streifen 19 und aus Seitenregionen 20 und 21. Die Dimensionen in der Fourier Transformationsebene sind: die dichteste Region des Modulators GH, 21, die mittlere Region HK, 19 und die weniger dichte Region KL, 20, wobei H und K  $\pm \theta_c$  entsprechen. G und L, die breiteste Dimension des Modulators entspricht  $\pm \theta_c$ , dem Winkel, der die Grenzfrequenz der Übertragungsfunktion des optischen Systems darstellt. In Fig. 4B wird die Übertragungsfunktion T (eine von vielen Möglichkeiten) so gewählt, daß

$$T\theta_c \gg \theta_c \gg T \pm \theta_c > T_{-\theta_c} \approx -\theta_c$$

Die Intensitätsvariation für das Objekt gemäß Fig. 3 ist in Fig. 5 dargestellt und für ein Objekt mit abgerundeten Kanten ist sie in Fig. 6 dargestellt. Die Bildintensitätsvariationen im oberen Teil von Fig. 5 und 6 stellen die Kontrastmodulation von Phasengradienten dar.

Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens, Phasenobjekte sichtbar zu machen, hängt ab von der Breite des Fadenbildes und vom Verhältnis der Durchlässigkeit der drei Abschnitte des Modulators.

Die relative Durchlässigkeit der drei verschiedenen Regionen des Modulators kann so gewählt werden, daß maximaler Kontrast erzielt wird. Licht, das durch die mittlere Region des Modulators weitergegeben wird, wird zur Hintergrundbeleuchtung des Bildes. Ein dunkelgrauer Hintergrund bietet maximalen

Kontrast für beleuchtete Brechungsindexgradienten. Zwischen den Modulatorregionen, die sich zu beiden Seiten der mittleren Region befinden, muß ein Intensitätsunterschied bestehen. Für den mittleren Schlitz wählt man eine ziemlich geringe Durchlässigkeit, wodurch sich ein relativ dunkelgrauer Hintergrund ergibt. Die Region 21 hat ungefähr eine halb so große Durchlässigkeit wie die mittlere Region; die Durchlässigkeit der Region 20 wird mit annähernd 100% gewählt. Das Verhältnis zwischen der Durchlässigkeit der Regionen 20, 21 ist ein Maßstab der möglichen Kontrastmodulation. In dem Maße, in dem das Verhältnis zunimmt, nimmt auch der Kontrast zwischen zwei Seiten kleiner Objekte zu. Ein weiterer Vorteil dieser Wahl der Durchlässigkeit für die Regionen 20, 21 besteht darin, daß sich ein dreidimensionales Bild beobachten läßt. Ein weiteres Ergebnis dieser Wahl der Modulatordurchlässigkeit besteht darin, daß die achsiale Interferenzebene in der Bildebene äußerst schmal ist, sodaß das sogenannte optische Aufteilen auftreten kann. In vielerlei Hinsicht ist das Erscheinen des Bildes in dieser Art von Mikroskop, nämlich im Kontrastmodulationsmikroskop, ähnlich der Erscheinung im Differenzinterferenzkontrastmikroskop.

Haben die drei oder mehr Modulatorregionen verschiedene Farben, so kann man im Bild zusätzliche Information über das Objekt erhalten. Für die mittlere Region 19 ist Blau zu empfehlen, was einen blauen Hintergrund für jene Teile des Bildes ergibt, die keine Phasengradienten darstellen. Das Auge ist der blauen Farbe gegenüber am wenigsten empfindlich. Die anderen Farben heben sich stärker ab und bieten eine größere Identifizierung von Gradienten. Die Farbauswahl für die anderen Regionen kann vielfältig sein. In diesem Beispiel wird in Region 21 Rot und in Region 20 Gelb gewählt. In der Bildebene haben ähnliche Brechungsindexgradienten gleiche Farben. Wird die optisch plane Glasplatte 4 senkrecht zur optischen Achse gekippt, so wird das Bild des Fadens auf die eine oder die andere Seite der mittleren Abstimmregion 19 des Modulators 8 verschoben. Diese Verschiebung des Lichtstrahles ändert die Hintergrundbeleuchtung, welche nun eine

Mischung von Strahlen aus der mittleren Region und aus der Region, in welche das Bild verschoben wurde, ist. Das Ausmaß der Kontrastmodulation wird für Neigungen in der Verschiebungsrichtung reduziert und für Neigungen in der anderen Richtung vergrößert. Das Auge kann ähnliche Gradienten in Farbe leichter unterscheiden als durch einen Modulator mit neutraler Densität. Farbe wird daher ähnliche Strukturen deutlicher erscheinen lassen. Ein bedeutender Vorteil dieses Kontrastmodulationsmikroskops besteht darin, daß die färbigen Abschnitte des Modulators, wie bereits erwähnt, mit einem Modulator neutraler Densität mit unterschiedlicher Lichtdurchlässigkeit gewählt werden kann. Es wird dann ein dreidimensionaler Effekt beobachtet, weil der Modulator neutraler Densität mit einem färbigen Bild kombiniert wird. In diesem neuartigen Mikroskop, dem Kontrastmodulationsmikroskop, können Farbentrennung und Übertragung neutraler Densität unabhängig voneinander und von der Einstellung der Optik gewählt werden und können der Natur des zu untersuchenden Objektes angepaßt werden, was mit einem Interferenz- oder Phasenkontrastmikroskop nicht möglich ist.

Gewünschtenfalls können die drei verschiedenen Modulatorregionen so beschaffen sein, daß sie verschiedene Phasenänderungen schaffen, in gewissem Sinne ähnlich der Phasenplatte in einem Phasenkontrastmikroskop, aber völlig verschieden in der Arbeitsweise. Das vorhin beschriebene Prinzip der unterschiedlichen Durchlässigkeit für die drei Modulatorregionen erzeugt ein Bild von Phasenobjekten, jedoch ohne Lichthof. Die Kontrastmodulationstechnik zeigt, daß ein Großteil der Lichthoferzeugung auf Phasengradienten zurückzuführen ist, welche im Kontrastmodulationsmikroskop deutlich sichtbar gemacht werden. Phasengradienten verursachen einen Lichthof und verdunkeln die Information im Phasenkontrastmikroskop.

Das Prinzip der Kontrastmodulation kann auf ein Mikroskopiersystem für reflektiertes Licht angewendet werden, wie dies in Fig. 7 gezeigt ist. Die verwendete Optik ist die gleiche wie für ein Verbundmikroskop unter Verwendung von

Episkop-Beleuchtung. Das Licht aus der Lichtquelle 22 wird durch eine Linse 23 gesammelt und tritt durch die Strahlenverschiebungssteuerung 26. Die Lichtquelle 22 ist wiederum eine Lampe mit rechteckigem oder bandförmigem Faden, wie vorhin beschrieben. Der Kondensor 25 wirft das Licht auf einen Strahlenaufteiler 27, welcher einen Strahl durch das Objektiv 28 auf ein opakes Objekt 29 lenkt. Das vom opaken Objekt reflektierte Licht tritt durch das Objektiv in die Fourier Transformationsebene 30, wo sich der Modulator befindet. Die Lichtstrahlen treten durch den Modulator in die Bildebene 31, welche durch das Okular 32 vergrößert und im Auge 33 abgebildet wird. Für das Mikroskop, welches mit reflektiertem Licht arbeitet, besteht die gleiche Vielfalt an Modifikationen wie für das Mikroskop, welches mit übertragenem Licht arbeitet.

Insbesondere bezugnehmend auf die Konfiguration des Modulators sind geeignete Ausführungsformen in Fig. 8, 9 und 10 dargestellt.

In Fig. 8 ist eine weitere Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Modulators 30 dargestellt.

Der Modulator 30, der, wie dargestellt, ein planares Stück Photofilm sein kann, hat eine lichte Fläche 31 und eine versetzte (offset) Fläche 32. Die lichte Fläche hat eine Durchlässigkeit von praktisch 100% und gestattet so dem Licht vom Objekt direkt hindurchzutreten. Die versetzte Fläche 32 hat eine geringe Durchlässigkeit von wesentlich weniger als 100% und ist nach einer Seite hin versetzt.

Das Bild des Fadens oder das Bild einer geeigneten Lichtöffnung wird innerhalb der Fläche 32 fokussiert, wie dies durch 33 bezeichnet ist. Ist kein Objekt in der Objekt ebene vorhanden, wird das Licht, das vom Faden oder von einer schlitzförmigen Öffnung ausströmt, innerhalb der Fläche 32 des Modulators 30 konzentriert, welcher sich in der vorhin beschriebenen Fourier Ebene befindet. Im versetzten Modulator gemäß Fig. 8 tritt das Licht, welches absorbiert worden wäre, nicht in die Bildebene durch. Das entspricht den vorhin beschriebenen Modulator-Konfigurationen gemäß Fig. 2A; in

jenem Modulator tritt das Licht der Gradienten, welche die dunkle Seite des mittleren Modulators passieren würde, auch nicht in die Bildebene ein.

Fig. 9 veranschaulicht eine weitere Modulator-Konfiguration.

Die mittlere Region 38 ist an ihrer Peripherie von den Streifen 36, 37, 39 und 40 umgeben. Jeder dieser Streifen hat eine unterschiedliche Durchlässigkeit, sodaß diese Konfiguration als variabler Modulator wirkt. Die periphere Region kontrolliert, wie bereits erwähnt, den Hintergrund des Bildes und Regionen ohne Gradientendensität.

Da der Kontrast von der Intensität des Hintergrundes abhängt, kann der Kontrast des Systems variiert werden, indem man den achsentfernten Schlitz oder das Fadenbild auf eine der Regionen 36, 37, 39 oder 40 abstimmt.

Wie aus der Zeichnung hervorgeht, wird die schlitzförmige Öffnung bzw. der Faden innerhalb der mit 36 bezeichneten Region fokussiert. Die Öffnung, bzw. der Faden könnte auch in den Regionen 37, 39 oder 40 abgebildet oder fokussiert werden, um dem betrachteten Bild verschiedene Kontrastverhältnisse zu geben.

In Fig. 10 ist ein Ringraum 45 dargestellt, welcher eine freie Region 46 eines Modulators 47 umgibt. Der Schlitz oder das Fadenbild 48 wird in der Fourier Ebene fokussiert, wo sich, wie bereits erwähnt, der Modulator 47 befindet. In dieser Anordnung braucht ein achsentfernter Schlitz oder ein Fadenbild nicht mit einer besonderen Orientierung nach dem Modulator ausgerichtet werden. Der Schlitz oder das Lichtbild muß nur in die vom Ring umgrenzte Region 45 fallen.

Die Konfiguration gemäß Fig. 10 macht auf diese Weise die Ausrichtung für jedes Mikroskop überflüssig.

Die vorhin beschriebenen Modulatoren verstärken das Bild und ermöglichen es, sogenannte transparente Objekte zu betrachten. Die Theorie der Arbeitsweise, wie sie in den mathematischen Beispielen dargestellt wurde, steht in Einklang mit bekannten Brechungsformeln.

Die Schärfe ist abhängig vom Ausgangslichtloch der Fourier Ebene, welches annähernd der freien Region des Modulators entspricht. In einem symmetrischen System, in dem die mittlere Region des Modulators auf der optischen Achse liegt, nähert sich die Schärfe der Formel

$$\lambda / \text{NA} \text{ obj}$$

äquivalent der axialen Beleuchtung. Für maximale Schärfe ist die mittlere Region zum Rand des Ausgangslichtloches hin versetzt; dann befindet sich die dunkle Seite des Modulators außerhalb des Ausgangslichtloches. Unter diesen Bedingungen nähert sich die Schärfe:

$$\lambda / 2 \text{NA} \text{ obj}$$

einer schräg einfallenden Beleuchtung. Die Lage der maximalen Energie für Gradienten ist  $\theta \approx i \pm \phi$ , wobei  $i$  der Winkel des einfallenden Lichtes ist.

So kann entweder in einem symmetrischen oder in einem nicht symmetrischen (versetzten) System die Amplitude der Lichtstrahlen beeinflußt werden, um das Betrachten des transparenten Objektes zu ermöglichen.

Während die Erfindung, wie vorhin beschrieben, insbesondere auf dem Gebiet der Mikroskopie angewendet wird, gibt es natürlich noch viele andere Anwendungsmöglichkeiten für die Kontrastmodulationstechnik und der Fachmann kann sich noch andere Ausführungsformen vorstellen, ohne dabei vom Geist und vom Umfang der Erfindung abzuweichen.

P a t e n t a n s p r ü c h e:

(1) Optisches System, insbesondere geeignet zur Verwendung in der Mikroskopie und geeignet zum Betrachten von Phasenobjekten mithilfe eines Lichtstrahles, gekennzeichnet durch

- eine in einem bestimmten optischen Weg hinter dem Objekt angeordnete Fourier Ebene,
- eine Einrichtung, die Regionen unterschiedlicher Densität aufweist, in der Fourier Transformationsebene angeordnet ist und den Abschnitten der Phasengradienten des Objektes entspricht, welche sich aus mittels dieser Einrichtung durchgeföhrten Modifikationen der Amplitude des Lichtstrahles relativ um eine bestimmte Region sowohl in größerer als auch geringerer Intensität ergeben, und durch
- eine Lichtquelle, welche in einer der Fourier Ebene konjugierten Ebene angeordnet ist und zur Beleuchtung des Objektes dient, wobei die Lichtquelle aus einer Lampe mit einem relativ planaren Faden besteht, um eine Lichtspur zu erzeugen, die in der bestimmten Region der Einrichtung registriert werden kann.

2. Optisches System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lampe einen Bandfaden aufweist.

3. Optisches System, insbesondere geeignet zum Betrachten eines Phasenobjektes, gekennzeichnet durch:

- eine erste Einrichtung zur Beleuchtung des Phasenobjektes, wobei die Einrichtung ein vorherbestimmtes Bild hat,
- eine Linse zum Fokussieren des Bildes in einer vorherbestimmten Ebene, wobei räumliche Frequenzen des Objektes und relativ maximale Energie für jeden Punkt auf dem Gradienten des Objektes verteilt werden, und
- eine zweite in der Ebene angeordnete Einrichtung zum selektiven Absorbiéren von Energie je nach dem Gradienten

des Objektes, um dem Betrachter zu ermöglichen, das Phasenobjekt aufgrund der Arbeitsweise der zweiten Einrichtung mit sichtbaren Kontrasteffekten zu betrachten, wobei die zweite Einrichtung um eine zentrale Region Energie sowohl in größerer als auch geringerer Intensität absorbiert.

5. Optisches System nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Einrichtung eine Lampe mit einem relativ rechteckigen Faden ist, welcher in der Ebene registriert werden kann.
6. Mikroskop umfassend eine Einrichtung zum Halten eines Objektes in Objektposition, eine Einrichtung, welche einen Lichtstrahl zur Beleuchtung des Objektes liefert, eine Kondensorlinse zum Konzentrieren des Strahles auf die Objektposition, ein auf die Objektposition fokussiertes Objekt zum Auffangen des Strahles, nachdem er das Objekt verlassen hat, und eine Bildebene zum Betrachten oder Anzeigen des Objektes, gekennzeichnet durch
  - a) eine Lichtquelle mit einer bestimmten Lichtspur, angeordnet in einer vorherbestimmten Ebene, wobei die Ebene eine zweite konjugierte Ebene definiert, in welcher sowohl die räumlichen Frequenzen des Objektes als auch die maximale Energie für jeden Punkt auf dem Gradienten des Objektes verteilt werden können, und
  - b) eine Einrichtung, welche in der konjugierten Ebene angeordnet ist und zum Verteilen des in der Bildebene hindurchtretenden Lichtes dient, wobei die Einrichtung Regionen unterschiedlicher Durchlässigkeit aufweist, welche Phasengradienten in sichtbare Kontrastinformation umwandeln können, wodurch ein Phasenobjekt betrachtet oder gezeigt werden kann, wobei mindestens zwei Regionen der Regionen unterschiedlicher Durchlässigkeit Flächen umfassen, die im wesentlichen eine Hälfte der konjugierten Ebene ausmachen.

7. Mikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle eine Lampe mit einem relativ eng gewendelten Faden ist, welcher in der konjugierten Ebene registriert werden kann.
8. Mikroskop umfassend eine Einrichtung zum Halten eines Objektes in einer Objektposition, eine Lichtquelle, welche in einer der Fourier Ebene konjugierten Ebene angeordnet ist und eine vorherbestimmte Lichtspur hat, eine Kondensor-einrichtung, welche auf die Lichtspur der Lichtquelle reagiert, ein auf die Objektposition fokussiertes Objektiv zum Auf-fangen der Lichtspur nach Verlassen des Objektes, eine Einrichtung zur Anzeige des wirklichen Bildes und eine Einrichtung mit Regionen unterschiedlicher Densität, welche Einrichtung in der der Ebene konjugierten Fourier Trans-formationsebene angeordnet ist und den Abschnitten der Phasengradienten des Objektes entspricht, welche sich aus mittels dieser Einrichtung durchgeföhrten Modifikationen der Amplitude des Lichtstrahles relativ um eine bestimmte Region sowohl in größerer als auch geringerer Intensität ergeben, wodurch beim Untersuchen eines transparenten Objektes mit Phasengradienten die Einrichtung zur Anzeige des Bildes das Objekt mit sichtbaren Kontrasteffekten anzeigt.
9. Mikroskop nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle eine Lampe mit einem im allgemeinen rechteckigen, eng gewendelten Faden ist.
10. Mikroskop gekennzeichnet durch
  - a) eine Lichtquelle, welche eine relativ rechteckige Licht-spur hat und in einer vorherbestimmten Ebene angeordnet ist,
  - b) eine Einrichtung zum Fokussieren der Lichtspur in einer Fourier Transformationsebene, wobei räumliche Frequenzen des Objektes und relative maximale Energie für jeden Punkt auf dem Gradienten des Objektes verteilt werden,

- c) einen Modulator mit einer mittleren Region von bestimmter Durchlässigkeit und zwei benachbarten Regionen mit unterschiedlicher Durchlässigkeit voneinander und von der mittleren Region, wobei der Modulator in der Fourier Transformationsebene angeordnet ist und dazu dient, die Amplitude der Lichtspur zu ändern, welche von einem Objekt je nach der Durchlässigkeit der einzelnen Regionen reflektiert wird, und
- d) eine Einrichtung zur Anzeige der geänderten Amplitude der Lichtspur, um das Objekt betrachten zu können.

11. Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle eine Lampe mit einem Faden ist, dessen Lichtspur in der zweiten Ebene fokussiert werden kann.

12. Kontrastmodulationsmikroskop umfassend eine Lichtquelle zur Beleuchtung des Objektes, eine Kondensoreinrichtung zum Konzentrieren des Lichtstrahles auf die Objektposition, ein auf die Objektposition fokussiertes Objekt zum Auffangen des Strahles nach Verlassen des Objektes, einen in der Fourier Transformationsebene angeordneten Modulator zum Verteilen des in der Bildebene hindurchtretenden Lichtes, dadurch gekennzeichnet, daß die Lampe einen relativ planaren Faden aufweist, um eine Lichtspur zu schaffen, welche in der Fourier Transformationsebene fokussiert werden kann.

